

# ヒトの染色体高精度分染法の検討 I

—濃淡を加味した 550 バンドイデオグラムの作成—

新 平 鎮 博

## Investigation of high resolution G-band pattern of human chromosomes I: —Shading pattern of 550-band idiogram—

SHIZUHIRO NIIHIRA

### 序

人の高精度染色体分染法が、1979年 Yunis<sup>5)</sup>らにより発表されてから人の染色体異常症の診断は飛躍的に向上し、詳細な欠損・過剰を診断できるようになってきた。現在、分析の際のバンドの同定・命名には、ISCN (An

International System for Human Cytogenetic Nomenclature) の標準的なイデオグラム<sup>1)~4)</sup> (Idiogram or Diagram) が使用されるが、イデオグラムは白黒のみで表現されているため、実際の分析に際してはバンドの同定が困難なことがある。本研究では、分析の効率・精度を向上させるため、ISCN の 550 バン

### ① 培養

20% FBS 加 RPMI 1640 10 ml 37°C 72hr  
PHA 0.2 ml .....> HARBEST  
Blood 0.5-1.0 ml \* 2 hr

\* コルヒチン (終濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、エチジウム・ブロマイド (終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を標本作成 2 時間前に添加する。

### ② 標本作成

① 遠沈 1000 rpm, 5min → 上清を捨てる  
↓  
HANKS 液 5 ml に浮遊後攪拌  
↓  
② 遠沈 1000 rpm, 5min → 上清を捨てる  
↓  
0.075 M KCl に浮遊後攪拌 (低張処理)  
37°C、15min インキュベータ  
↓  
③ 遠沈 1000 rpm, 5min → 上清を捨てる  
↓  
カルノア液 5ml (固定)、15min  
↓  
④ 遠沈 1000 rpm, 5min → 上清を捨てる  
↓  
沈査が白くなるまで繰り返す  
↓  
70% エタノール中のスライド上に細胞懸濁液をおとす。(標本作成)

### ③ G 分染 (GTG:トリブシン-ギムザ染色)

60°C、2×SCC 60min 処理 → 水洗  
↓  
0°C、0.25%トリブシン 1~5sec 処理  
↓  
5%ギムザ液、5min → 水洗後、乾燥

図 1 高精度分染法

(1)

ドのイディオグラムに濃淡を加え、写真に近似させる事を試みた。さらに、作成したバンドの濃淡についての安定度（ばらつき）についても検討を行った。

## 方 法

### I・標本作成

抹消血の全血培養法<sup>6)</sup>，池内のエチジウム・ブロマイド添加法<sup>7)</sup>を用い，トリブシン・ギムザバンド（GTG）のG一分染法による高精度分染法を用いて分析を行った。

### II・分析にもちいた核型

6人の正常人（男女各3名）を対象とし，約550バンドの染色体が得られた細胞について，ISCNに基づいて分析を行った。重なりや，同定が出来なかった染色体を除いても，各個人に付き，それぞれの染色体が5本以上分析できるように5つの核型を作成した。

### III・濃淡分析

ISCNに基づいて550バンドの同定後，黒のバンドについて濃淡を3段階に分けた。標本により全体の色には

らつきがあるので視覚に基づいて相対的に分類した。なお，今回対象にしたバンドは，550バンドイディオグラム中，サテライト，可変部分を除く225の黒のバンドである

### IV・イディオグラムの作成

それぞれの個人について平均値と標準偏差（SD-I）を計算した。その後全体の平均と標準偏差（SD-T）を計算した。全体の値を表1に示すような基準によって3等分して濃淡段階としてイディオグラムを作成した。

## 結 果

実際に分析に用いた核型を図2に示す。

濃淡分析を行った後，計算した全体の平均と標準偏差（ $M \pm SD$ ）を各バンドごとに表2で示す。各バンドの全体の平均値を表1の基準に基づいてそれぞれのバンドごとの濃淡段階を決定した。濃淡段階によるバンドの数は，表3左側に示したように，ほぼ3等分された。次にそれに基づいて作成したイディオグラムは，図3にしめ

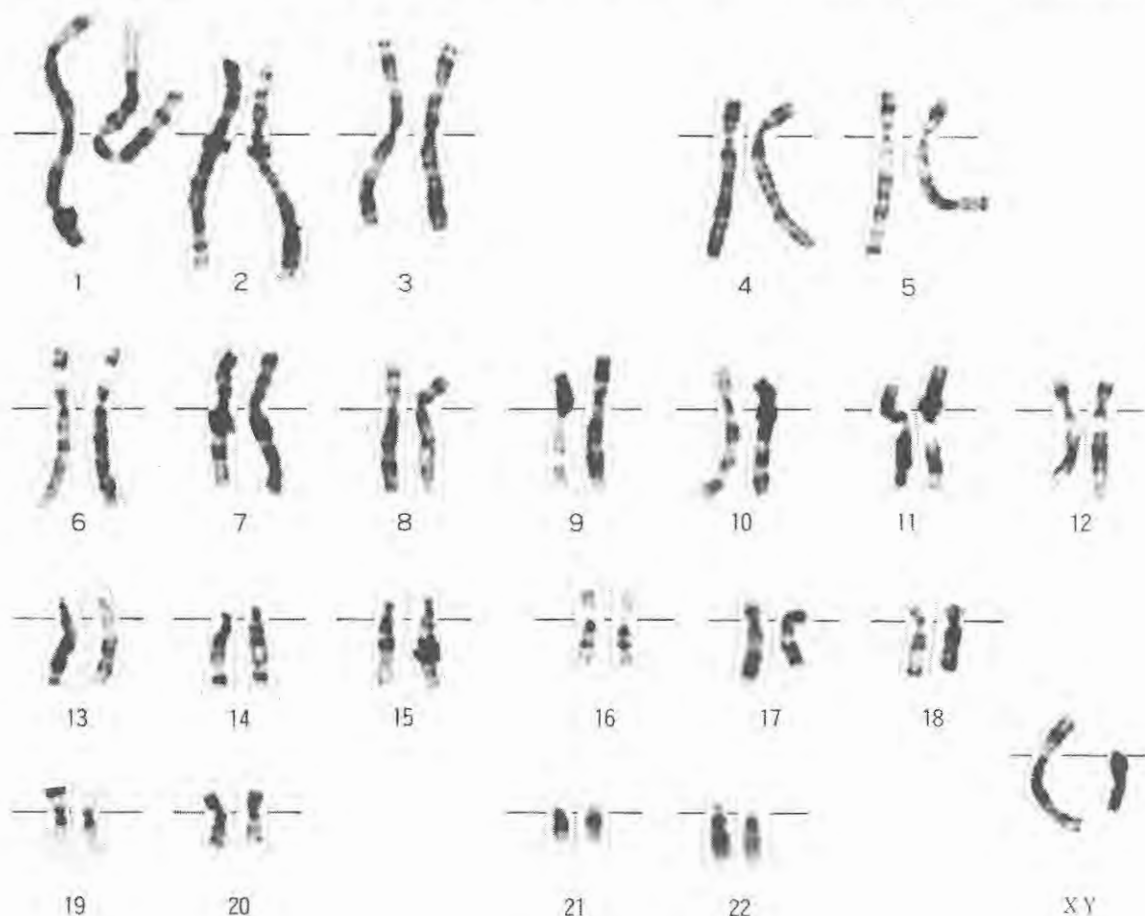


図2 実際に使用した核型

(2)

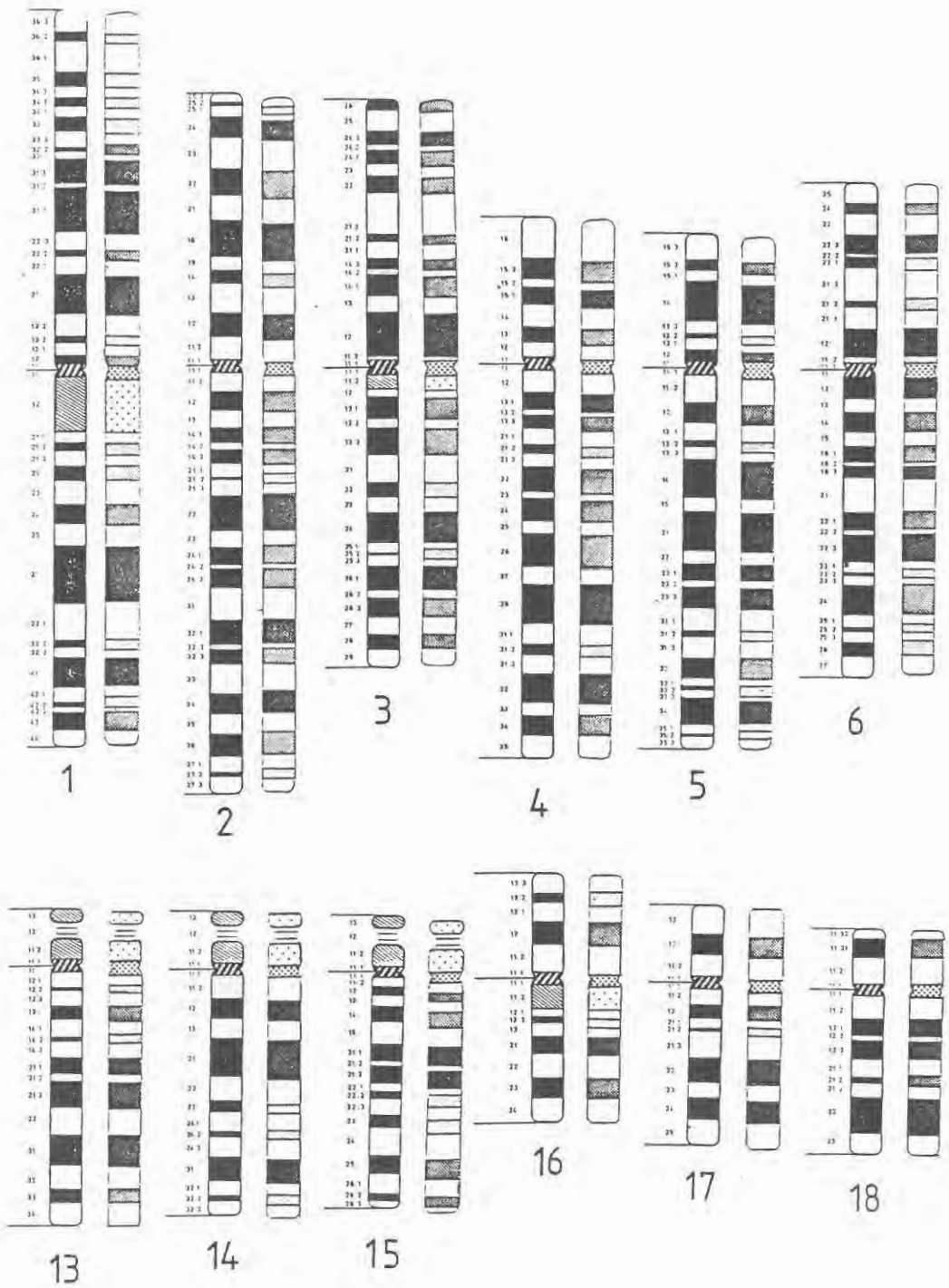
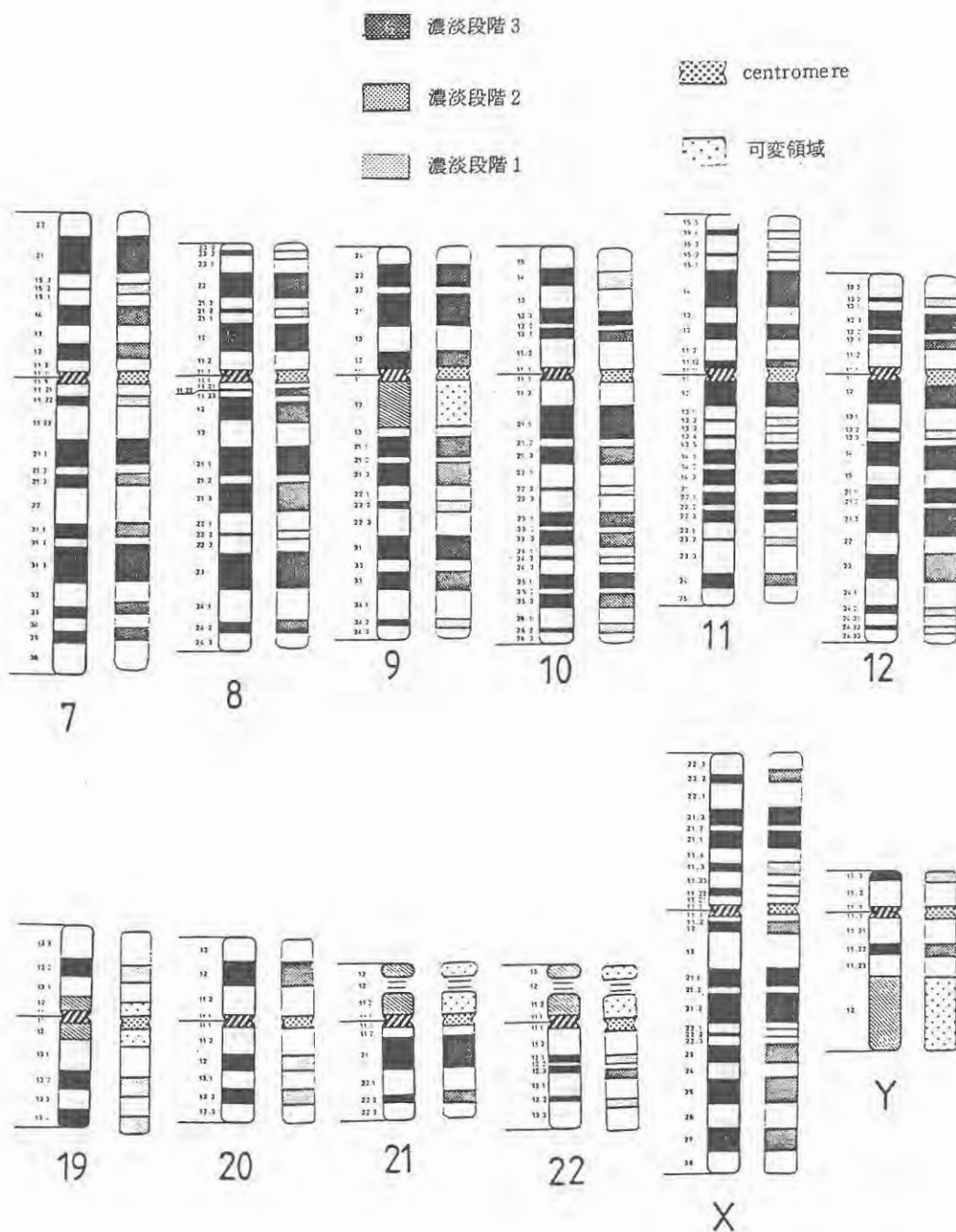


図3 濃淡を加味した550バンドイディオグラム  
濃淡イディオグラム



大阪市立大学生活科学部児童保健学

表1 イデオグラム作成の為の濃淡段階を決定する基準

濃淡分析の全平均値	濃 淡 段 階
1.00 ~ 1.66	(1)
1.67 ~ 2.33	(2)
2.34 ~ 3.00	(3)

す。左がISCNのオリジナルであり、右側が今回作成した濃淡を加味したイデオグラムである。図2の実際の標本と比べても分かりやすくなっている。

次に、濃淡のばらつきについて検討を加えた。先に述べたように、個人内でのばらつき ( $SD-I > 0.6$ )、個人間でのばらつき ( $SD-T > 0.20$ ) が大きいバンドを表2の右側の部分に記号で示している。

$SD-I$  についてばらつきの大きいのは、各バンドとも1~2人であり、特定の個人ではなかった。濃淡別に

表2 濃淡分析結果と不安定度

$SD-I$  : ● = 個人内のSDが0.6以上

$SD-T$  : △ = 0.2~0.25、○ = 0.25~0.30、◎ = 0.30~

ISCN : ■ = 1982年版ISCNと違う値を示したもの

染色体No 1

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	ISCN
p	36.2 1.37±0.16			
	35 1.32±0.20		△	
	34.2 1.30±0.11			
	33 1.41±0.12			
	32.2 1.94±0.16			■
	31.3 2.66±0.14			■
	31.1 2.87±0.06			
	22.2 1.83±0.10			■
	21 2.90±0.11			
	13.2 1.26±0.22		△	
	12 1.70±0.23		△	■
q	21.2 1.12±0.12			
	22 1.62±0.28		○	■
	24 2.01±0.07			
	31 2.86±0.07			
	32.2 1.43±0.23		△	
	41 2.71±0.09			
	42.2 1.19±0.16			
	43 2.27±0.12	●		

染色体No 2

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	ISCN
p	25.2 1.39±0.23	●	△	
	24 2.48±0.19			■
	22 2.15±0.33	●	◎	
	16 2.64±0.12			
	14 1.20±0.17			■
	12 2.81±0.15			
q	12 1.89±0.27	●	○	■
	14.1 1.93±0.09			
	14.3 1.86±0.27		○	■
	21.2 1.06±0.12			
	22 2.64±0.19			
	24.1 1.89±0.17			
	24.3 2.18±0.11			
	32.1 2.36±0.24		△	■
	32.3 2.00±0.24	●	△	
	34 2.46±0.29		○	
	36 2.13±0.08	●		
	37.2 1.18±0.22		△	

染色体No. 3

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN	
p	26.3	1.80±0.20	●	△	■
	24.3	2.76±0.08			
	24.1	2.31±0.07	●		
	22	1.84±0.25		○	■
	21.2	1.79±0.17			
	14.3	2.02±0.12			■
	14.1	2.24±0.15			
	12	2.83±0.31		◎	
q	13.1	2.17±0.16			
	13.3	2.22±0.20	●	△	
	22	1.53±0.42		◎	
	24	2.48±0.24		△	
	25.2	1.49±0.27		○	
	26.1	2.66±0.26		○	
	26.3	2.31±0.20	●	△	
	28	1.73±0.16	●		■

染色体No. 5

バ ン ド		M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	15.2	1.89±0.18	●		■
	14	2.87±0.09			
	13.2	1.45±0.07			
	12	2.06±0.09			■
q	12	2.15±0.21		△	
	13.2	1.35±0.17			
	14	2.64±0.19			
	21	2.69±0.19			
	23.1	2.34±0.25		○	
	23.3	2.38±0.23		△	
	31.2	1.05±0.11			
	32	2.07±0.13			
	33.2	1.44±0.26		○	
	34	2.54±0.12			
	35.2	1.16±0.21		△	

染色体No. 4

バンド		M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
p	15.3	1.94±0.42	●	◎	
	15.1	2.64±0.16	●		
	13	2.05±0.26	●	○	
q	13.1	2.56±0.11			
	13.3	1.74±0.28		○	
	21.2	1.42±0.16			
	22	2.28±0.16	●		■
	24	1.85±0.13			
	26	2.30±0.15			
	28	2.56±0.29		○	■
	31.2	1.37±0.25	●	○	
	32	2.50±0.18	●		■
	34	2.22±0.21	●	△	

染色体No. 6

バンド		M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	24	1.78±0.20		△	■
	22.3	2.42±0.21		△	■
	22.1	1.08±0.08			
	21.2	1.07±0.05			
	12	2.69±0.08			
q	12	2.52±0.09	●		■
	14	2.00±0.22	●	△	
	16.1	2.32±0.24		△	■
	16.3	2.41±0.20		△	
	22.1	2.10±0.23	●	△	
	22.3	2.38±0.15			■
	23.2	1.37±0.34		◎	
	24	2.10±0.15			■
	25.2	1.63±0.24		△	■
	26	1.37±0.20		△	

染色体No. 7

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	21	2.89±0.01		
	15.2	1.54±0.19		
	14	2.16±0.11		
	12	2.12±0.20	●	△ ■
q	11.	1.59±0.21	△	
	21.2	2.87±0.14		
	21.1	2.13±0.13		
	31.3	2.23±0.09		
	31.1	2.68±0.17		
	33 3	1.73±0.17		■
	33	1.98±0.15		

染色体No. 8

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	23.2	1.50±0.13		
	22	2.59±0.25	○	
	21.2	1.13±0.15		
	12	2.44±0.25	○	■
q	11.2	2.00±0.19		■
	12	1.77±0.56	◎	
	21.1	2.34±0.28	○	
	21.3	2.31±0.14		■
	22.2	1.10±0.08		
	23	2.66±0.11		
	24.2	1.70±0.18	●	

染色体No. 9

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	23	2.54±0.14		■
	21	2.74±0.18		
	12	2.00±0.35	◎	
q	21.1	2.32±0.30	◎	■
	21.3	2.30±0.20	△	■
	22.2	1.14±0.16		
	31	2.62±0.09		
	33	2.14±0.12		
	34.2	1.62±0.12		

染色体No. 10

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	14	1.58±0.21	△	
	12.3	2.35±0.23	△	■
	12.1	1.72±0.23	△	■
q	21.1	2.93±0.09		
	21.3	2.31±0.16	●	
	22.2	1.00±0.00		
	23.1	2.16±0.09		■
	23.3	2.06±0.07		
	24.2	1.01±0.05		
	25 1	2.48±0.08		■
	25.3	1.96±0.11		■
	26.2	1.13±0.03		

染色体No. 11

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	15.4	1.64±0.45	◎	
	15.2	1.56±0.27	○	
	14	2.87±0.24	△	
	12	2.65±0.33	◎	
	11.1	2.04±0.20	△	■
	12	2.45±0.23	●	■
q	13.2	1.01±0.41	◎	
	13.4	1.09±0.26	○	
	14.1	2.34±0.15		
	14.3	2.55±0.16		
	22.1	2.79±0.19		
	22.3	2.66±0.21	△	
	23.2	1.40±0.29	○	
	24	1.90±0.08		■



染色体No 12

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	13.2	1.07±0.08		■
	12.3	2.78±0.15		
	12.1	1.98±0.08		■
q	12	2.47±0.19	●	■
	13.2	1.03±0.05		
	14	2.39±0.12		■
	21.1	2.34±0.24	△	■
	21.3	2.75±0.12		
	23	2.13±0.12		
	24.2	1.13±0.13		
	24.3	1.21±0.10		

染色体No 13

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
q	12.2	1.35±0.13		
	13	2.30±0.15		
	14.2	1.23±0.16		
	21.1	2.66±0.11		
	21.3	2.72±0.09		
	31	2.82±0.12		
	33	2.00±0.22	●	△

染色体No 14

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
q	12	2.35±0.19		■
	21	2.82±0.10		
	23	1.58±0.51	◎	■
	24.2	1.16±0.13		■
	31	2.83±0.12		
	32.2	1.31±0.21	△	

染色体No 15

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
q	12	1.82±0.27	●	○
	14	2.27±0.16		■
	21.1	2.42±0.28	○	
	21.3	2.38±0.18		
	22.2	1.28±0.08		
	23	1.40±0.15		
	25	1.97±0.22	●	△
	26.2	1.74±0.11		■

染色体No 16

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	13.2	1.66±0.14	●	
	12	1.70±0.22	△	■
q	12.2	1.24±0.18		
	21	2.59±0.17	●	
	23	1.92±0.16	●	

染色体No 17

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	12	2.29±0.16		
q	12	1.82±0.13		■
	12.2	1.15±0.15	●	
	22	2.56±0.07		■
	24	2.34±0.09		■

染色体No 18

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I S C N
p	11	1.77±0.19		■
q	12.1	2.59±0.22	△	■
	12.3	2.61±0.13		■
	21.2	1.88±0.36	●	◎
	22	2.53±0.25	●	○



染色体No 19

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
p 13.2	1.30±0.15			
q 13.2	1.41±0.24		△	
13.4	1.30±0.19			

染色体No 20

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
12	2.13±0.13	●		
q 12	1.50±0.23	●	△	
13.2	1.55±0.10	●		■

染色体No 21

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
q 21	2.90±0.13			
22.2	1.67±0.21		△	■

染色体No 22

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
q 12.1	1.45±0.39		◎	
12.3	1.95±0.10			■
13.2	1.02±0.04			

X染色体

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
p 22.2	1.76±0.18			■
21.3	2.50±0.31		◎	
21.1	2.83±0.20		△	
11.3	1.37±0.39		◎	■
11.2	1.20±0.26		○	
q 11.2	1.94±0.24		△	■
21.1	2.51±0.21		△	
21.3	2.87±0.18			
22.2	1.31±0.11			
23	2.03±0.32		◎	
25	2.20±0.28	●	○	■
27	2.23±0.22	●		■

Y染色体

バンド	M±SD	SD-I>0.6	SD-T>0.2	I SCN
p 11.3	1.64±0.33		◎	
q 11.2	2.23±0.02			■

表3 濃淡別に見たバンドの出現率と濃淡の安定性に付いて

濃淡段階	バンド数	濃淡の安定性 (バラつき)		I SCNとの比較 (一致率%)
		SD-I>0.6 *	SD-T>0.3 *	
(1)	68	5 ( 7.5%)	7 ( 10.3%)	60 ( 88.2%)
(2)	83	29 ( 35.6%)	7 ( 8.4%)	38 ( 45.8%)
(3)	74	7 ( 9.5%)	2 ( 2.7%)	56 ( 75.7%)

\*SD-I=個人内のバラつき、SD-T=個人間のバラつき

不安定なバンドの出現率を表3に示しているが、濃淡段階2のバンドに多かった。

さらに、SD-Tについては、SD-Iととくに関係なく、濃淡とも関係なく、ばらつきの少なかった事示している(表3)。また、SDでは表現されないが、特に他の人とかけ離れた値を示すものもなかった。

### 考 察

染色体が分染される際に、バンドに濃淡がある事は早

くから気付かれていたが、まとまった研究は多くない。通常バンドでは、Rayら<sup>10)</sup>、石井ら<sup>8)</sup>により、高精度分染法にかんしては、Francke<sup>9)</sup>らによって発表されている。Franckeらは、独自の分類でバンドを決めているので実際には使用されない。本研究では、現在、命名の基準に使用されるISCNに基づいて濃淡分析を行った。

ところで、ISCNでは研究者によりバンドの濃淡が異なることから、1981年までは、あえて白黒で表現していたが、1985年版<sup>4)</sup>では、Franckeらのものを参考に付図

(10)

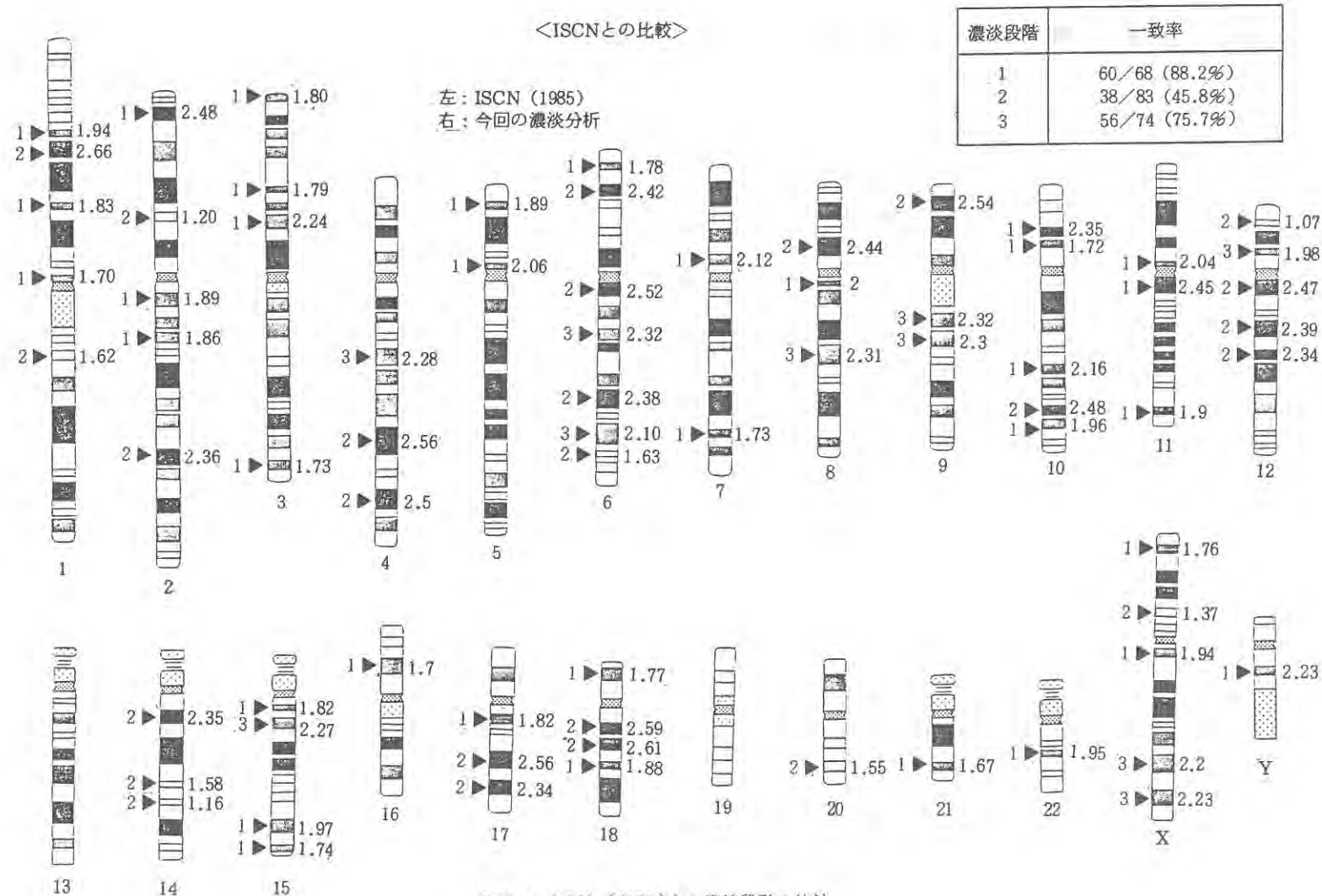


図4 ISCN (1985)との濃淡段階の比較

として採用している。採用理由については、バンドを同定する時の指標とするためと説明されており、本研究での、分析に際して効率・精度を上げる目的と一致する。しかし、ISCNでは、結果のみを示しており、その過程については十分説明されていない。そこで、今回、我々の結果と比較したところ（表2、図4）、概ね一致していたが、特に濃淡段階2のバンドで一致率が悪かった（表3）。しかし、濃淡段階2は、中間的なバンドであり、濃淡を決める基準により我々の結果とも一致するものも多く、全体としては濃淡が標準化できる。また、2p24, 3p14.1 5p12, 7p12, 8q11.22, 10p12.3, 10q23.1, 11q12, 12p12.1, Yq11.22の10バンドは差が大きく、個人差、人種差、テクニカルな差を検討する必要がある。

以上の事より、我々の結果も含めて考えると、ある程度の標準は作成できると思われる。標準化する際に、石井ら<sup>8)</sup>も指摘したように、個人間、個人内での濃淡のばらつきの見られるバンドを不安定バンドという概念で補助すれば、標準イデオグラムとして十分使用でき、高精度分染法の分析効率をあげる。逆に、ISCNでは示されていないが、濃淡バンドを用いて分析する際には、不安定バンドという補助が必要である。

次に、本研究の有用性を示す1例を図5に掲げた。症例は、2番染色体遠位部に過剰バンドを有しているが、ISCNでは判定困難であった。しかし、我々のイデオグラムを用いて、inv dup (2) (p 23→p 25.3 :: p 25.3 →qter) と診断したものである。

現在、DNAを用いた遺伝子診断がなされるが、人の全DNAを診断できるのは、先のことである。効率よくDNA診断を行うためにも、染色体分析は欠かせないものであり、その際、濃淡を利用した分析で、染色体レベルでの様々な情報を提供する事は重要である。

さらに、デンストメータにより客観的な分析を行い、濃淡を用いて染色体の同定の効率を高めることで、コンピュータとの連動による高精度分染法の自動分析への応用の可能性もあり、今後の課題としたい。

## 要 約

人の高精度分染法による分析に際しては、An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)の標準イデオグラムに基づいて行われる。しかし、イデオグラムは、白黒で表現されているため、分析に際して写真との間に差が大きく同定が困難である。

本研究では、ISCNの550バンドイデオグラムに基づいて、黒いバンドに濃淡をつけた。3段階に分類したが、濃いバンド、中間バンド、淡いバンドで、それぞれ、68/225, 83/225, 74/225にほぼ三分され

(通常分染法)



(高精度分染法) inv dup (2) (p 23→p 25.3 :: p 25.3 →qter)

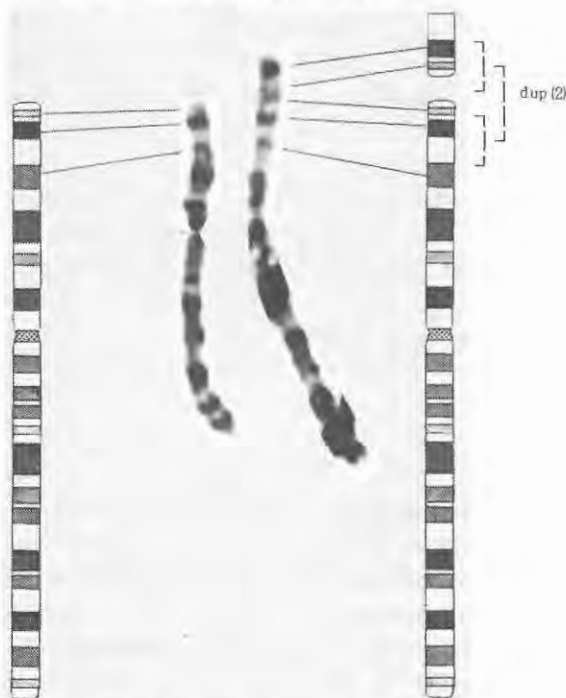


図5 濃淡イデオグラムの使用例:dup (2)

た。さらに、個人間、個人内によるばらつきを検討した。1985年版ISCNに新たに付図された濃淡イデオグラムとも比較を行ったが、2/3が一致しており、中間のバンドで一致率が悪かったが、大きな差は認められなかった。

以上、バンドの濃淡について標準化でき、本イデオグラムを分析に使用することで、バンド同定における効率が向上するものと思われる。

最後に、本研究で終始御指導頂き、本論文の御校閲を頂いた、藤田弘子先生、本研究にご協力頂いた広野多美さんに深謝致します。

## 参 考 文 献

- 1.) Paris Conference (1971): Standardization in

- human cytogenetics. Birth defects : Original Foundation, New York, 1972; also in Cytogenetics 11 : 313-362 (1972)
- 2) ISCN (1978) : An Internatinnal System for Human Cytogenetic Nomenclature. Birth Defects : Orginal Article Series, Vol 14, No 8, The National Foundation, New York 1978 ; also in Cytogenet Cell Genet 21 : 309-404 (1978)
- 3) ISCN (1981) : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature - High Resolut on Banding (1981). Birth Defects : Orginal Article Series, Vol 17 No 5, March of Dimes Birth Defects Foundation, New York 1981; also in Cytogenet Cell Genet 31 : 1-23 (1981).
- 4) ISCN (1985) : An International System fom Human Cytogentic Nomenclature. Birth Defects : Orginal Article Series, Vol 21 No 1, March of Dimes Birth Defects Foundation, New York (1985).
- 5.) Yunis, J. J. : high resolution of human chromosomes. Science 191 : 1268-1270. (1976).
- 6.) 藤田弘子 : 染色体検査. 病理形態検査. (8 巻. 手島寛編.) 医学書院.
- 7.) Ikeuchi, T. and Sasaki, M. : Accumulation of early mitotic cells in ethidium bromide treated human lymphocyte culture. Human Genet. 57, 93-95 (1981).
- 8.) 石井ふみ代, 藤田弘子 : ヒト染色体の分析に関する研究—濃淡を加味した G-バンド模式図の作成・本紀要・26 巻, 165-170 (1978).
- 9.) Francke, U. and Oliver, N. : Quantitative analysis of high resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. Hum. Genet. 45 : 137-165 (1978).
- 10) Ray, M., Canning, N. and Hamerton, J.L. : The human complement after trypsin pretreatment as compared to the paris Standard. Humangenetik 29, 29-34 (1975).

(昭和61年11月11日受理)

### Summary

Standard idiograms of An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) are used to analyze high resolution G-bands of human chromosomes. Idiograms are expressed in black and white, but it is not enough to analyze them accurately. We studied 550-band idiograms using their shading pattern. We classified the 225 dark bands into three degrees of darkness. There were 68 very dark bands, 83 moderately dark bands, and 74 lightly dark bands. Some bands showed individual differences. The pattern of shading corresponded fairly well to analysis of ISCN idiograms (154 of 225 bands). This method should increase the efficiency of analysis of high resolution G-bands of human chromosomes.